

УДК 577.112.6:615.214.31

АНКСИОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НЕЙРОПЕПТИДА ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА ОПОСРЕДОВАН АМРА- И TRKB-РЕЦЕПТОРАМИ

© 2020 г. член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1,*}, П. Ю. Поварнина¹, К. Н. Колясникова¹,
А. Г. Аляева¹, О. Н. Воронцова¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 20.03.2020 г.
После доработки 23.03.2020 г.
Принято к публикации 23.03.2020 г.

Ранее нами было показано, что нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором АМРА-рецепторов и высказано предположение о связи фармакологических эффектов ЦПГ с мозговым нейротрофическим фактором. В настоящей работе впервые показано предотвращение анксиолитического эффекта ЦПГ блокатором АМРА-рецепторов DNQX и блокатором TrkB-рецепторов K252A, что подтверждает сформулированную гипотезу.

Ключевые слова: циклопролилглицин, анксиолитическая активность, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), TrkB, АМРА

DOI: 10.31857/S2686738920040113

Цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) сконструирован в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова как топологический аналог и предполагаемый эндогенный пептидный прообраз классического ноотропа пирацетама [1]. В 1996 г. ЦПГ действительно был идентифицирован в головном мозге крыс как эндогенное соединение в концентрации $\sim 10^{-6}$ М [2]. Недавно ЦПГ обнаружили и у человека в плазме крови и цереброспинальной жидкости в концентрациях $\sim 10^{-7}$ М [3]. Предполагается, что в организме ЦПГ образуется из трипептида Gly-Pro-Glu, *N*-концевого метаболита инсулиноподобного фактора роста [4].

ЦПГ в экспериментах на животных проявляет спектр фармакологических эффектов, характерный для пирацетама, но в дозах на 2–3 порядка ниже. Так, у циклодипептида выявлены ноотропная [1, 2], анксиолитическая [5], нейропротекторная [4], анальгетическая [6] и антидепрессивная [7] активности. В 2016 году нами было установлено [8], что ЦПГ увеличивает АМРА-токи на изолированных клетках Пуркинью мозжечка крыс, обладая, таким образом, свойствами положительного модулятора глутаматных АМРА-рецепторов. Для пирацетама и некоторых других рацетамов известно влияние на АМРА-рецепто-

ры, опосредующее замедление десенситизации и деактивации последних [9]. Кроме того, с использованием культур нейрональных клеток было показано [10], что ЦПГ вызывает характерное для положительных модуляторов АМРА-рецепторов [11] увеличение уровня мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF). Стимуляция синтеза BDNF под действием ЦПГ была обнаружена и в экспериментах *in vivo* на модели болезни Альцгеймера у крыс, индуцированной внутримозговым введением β -амилоида, где нейропротекторное действие ЦПГ было сопряжено с увеличением уровня мРНК BDNF и активацией ERK сигнального пути [12].

Эти данные позволяют предположить, что фармакологические эффекты ЦПГ обусловлены стимуляцией BDNF/TrkB сигналинга, опосредованной активацией АМРА-рецепторов. Для проверки этого предположения в данной работе мы изучили влияние блокатора АМРА-рецепторов DNQX и блокатора TrkB-рецепторов K252A на анксиолитическую активность ЦПГ в тесте поднятого крестообразного лабиринта (ПКЛ).

Исследование выполнено на 80 мышах-самцах линии Balb/C массой 20–22. При работе соблюдали требования, сформулированные в Приказе Минздрава РФ № 199 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” и в Решении Совета ЕЭК № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического Союза в сфере обращения

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, Россия

*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Таблица 1. Блокатор AMPA рецепторов DNQX полностью снимает анксиолитические эффекты ЦПГ в ПКЛ

Экспериментальные группы (<i>n</i> = 10 в каждой группе)	Время в открытых рукавах, с	Процент времени в открытых рукавах	Заходы в открытые рукава	Процент заходов в открытые рукава
контроль	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ЦПГ (0.1 мг/кг)	3.7 ± 1.7*	1.9 ± 0.9*	0.5 ± 0.2	7.3 ± 4.2
ЦПГ (0.1 мг/кг) + DNQX (10 мг/кг)	0 ± 0[#]	0 ± 0[#]	0 ± 0	0 ± 0
DNQX (10 мг/кг)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, [#] – $p < 0.05$ по сравнению с группой “ЦПГ” (U-тест Манна–Уитни).

Таблица 2. Блокатор нейротрофиновых тирозинкиназных рецепторов K252A полностью снимает анксиолитические эффекты ЦПГ в ПКЛ

Экспериментальные группы (<i>n</i> = 10 в каждой группе)	Время в откры- тых рукавах, с	Процент времени в открытых рукавах	Заходы в откры- тые рукава	Процент заходов в открытые рукава
контроль	3.4 ± 2.4	1.6 ± 1.1	0.3 ± 0.2	4 ± 2.3
ЦПГ (1.0 мг/кг)	23.1 ± 11.8*	9.8 ± 5.1*	3 ± 2*	21.7 ± 9.1*
ЦПГ (1.0 мг/кг) + K252A (25 мкг/кг)	2.5 ± 1.5 [#]	1.2 ± 0.8 [#]	0.4 ± 0.2 [#]	7.7 ± 5 [#]
K252A (25 мкг/кг)	9.1 ± 4.9	5.9 ± 3.2	0.8 ± 0.3	10.6 ± 4.6

Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, [#] – $p < 0.05$ по сравнению с группой “ЦПГ” (U-тест Манна–Уитни).

лекарственных средств”. Все манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Засова”.

ЦПГ растворяли в дистиллированной воде и вводили мышам внутривенно (в/б) в дозах 1.0 (эксперимент с K252A) или 0.1 мг/кг (эксперимент с DNQX) за 15 мин до теста ПКЛ. Дозы ЦПГ 1.0 мг/кг и 0.1 мг/кг были выбраны на основании предварительных экспериментов как наиболее активные, соответственно, при слабом рассеянном освещении (освещенность открытых рукавов 10–15 люкс) и при ярком освещении открытых рукавов (400–500 люкс). Соединение K252A растворяли в 0.1% ДМСО на физиологическом растворе и вводили в/б в дозе 25 мкг/кг [13] непосредственно перед введением ЦПГ. Соединение DNQX, растворенное в 1% DMSO на физиологическом растворе, вводили в/б в дозе 10 мг/кг [14] за 15 мин до ЦПГ.

Блокатор AMPA-рецепторов DNQX в дозе 10 мг/кг не влиял на поведение мышей в тесте ПКЛ (см. табл. 1). ЦПГ в варианте теста ПКЛ с ярко освещенной ареной демонстрировал статистически значимый эффект по двум наиболее важным параметрам, характеризующим анксиолитическую активность, увеличивая как время пребывания, так и процент времени в открытых рукавах. DNQX, введенный совместно с ЦПГ, препятствовал проявлению анксиолитической активности ЦПГ по обоим параметрам (табл. 1). Таким образом, AMPA-рецепторы включены в

фармакодинамические механизмы анксиолитической активности ЦПГ.

Блокатор TrkB, соединение K252A, в тесте ПКЛ в дозе 25 мг/кг не изменял времени в открытых рукавах, процента времени в открытых рукавах, числа заходов в открытые рукава и процент заходов в открытые рукава по сравнению с контролем. ЦПГ в условиях умеренно освещенной арены по каждому параметру демонстрировал анксиолитическую активность. При добавлении K252A анксиолитическая активность ЦПГ не зарегистрирована (табл. 2), следовательно BDNF/TrkB сигналинг участвует в формировании анксиолитической активности ЦПГ.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают участие TrkB-зависимых, опосредованных активацией AMPA-рецепторов, механизмов в действии ЦПГ, что характерно для ампакинов. Полученные данные позволяют характеризовать ЦПГ в качестве эндогенного ампакина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 20-015-00102 “Выявление роли глутаматергического и BDNF-ергического механизмов в фармакологических эффектах нейротрофинового пептида цикло-пролилглицина”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Maksimova F.V., et al.* Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity // *Pharm. Chem. J.* 1989. V. 23. P. 203–208.
2. *Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., et al.* Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain // *FEBS Letters.* 1996. V. 391. P. 149–152.
3. *Fan D., Krishnamurthi R., Harris P., et al.* Plasma cyclic glycine proline/IGF-1 ratio predicts clinical outcome and recovery in stroke patients // *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2019. V. 6. № 4. P. 669–677.
4. *Guan J., Gluckman P.D.* IGF-1 derived small neuropeptides and analogues: A novel strategy for the development of pharmaceuticals for neurological conditions // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. № 6. P. 881–891. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00256.x>
5. *Gudasheva T.A., Konstantinopol'skii M.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B.* Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test // *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2001. V. 131. № 5. P. 464–466.
6. *Ferro J.N., de Aquino F.L., de Brito R.G., et al.* Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice // *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* 2015. V. 42. № 12. P. 1287–1295. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12480>
7. *Garibova T.L., Gudasheva T.A., Seredenin S.B.* A New Component in the Mechanism of Regulation of Endogenous Depressive-Like States // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 488. № 1. P. 324–326. <https://doi.org/10.1134/S1607672919050107>
8. *Gudasheva T.A., Grigoriev V.V., Koliashnikova K.N., et al.* Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 471. № 1. P. 387–389. <https://doi.org/10.1134/S160767291606003X>
9. *Ahmed A.H., Oswald R.E.* Piracetam defines a new binding site for allosteric modulators of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) receptors // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. № 5. P. 2197–2203. <https://doi.org/10.1021/jm901905j>
10. *Gudasheva T.A., Koliashnikova K.N., Antipova T.A., Seredenin S.B.* Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 469. № 1. P. 273–276. <https://doi.org/10.1134/S1607672916040104>
11. *Jourdi H., Hsu Y.T., Zhou M., et al.* Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 27. P. 8688–8697. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6078-08.2009>
12. *Aguado-Llera D., Canelles S., Fernández-Mendivil C., et al.* Improvement in inflammation is associated with the protective effect of Gly-Pro-Glu and cycloprolylglycine against A β -induced depletion of the hippocampal somatostatinergic system // *Neuropharmacology.* 2019. V. 151. P. 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.008>
13. *Mao Q.Q., Huang Z., Zhong X.M., Xian Y.F., Ip S.P.* Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice // *Behav. Brain Res.* 2014. V. 261. P. 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.12.020>
14. *Rial D., Takahashi R.N., Morato G.S.* Aniracetam and DNQX affect the acquisition of rapid tolerance to ethanol in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009. V. 92. № 1. P. 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.10.006>

THE ANXIOLYTIC EFFECT OF THE NEUROPEPTIDE CYCLOPROLYLGLYCINE IS MEDIATED BY AMPA AND TrkB RECEPTORS

Corresponding Member of the RAS **T. A. Gudasheva^{a, #}**, **P. Yu. Povarnina^a**, **K. N. Koliashnikova^a**, **A. G. Alyaeva^a**,
O. N. Vorontsova^a, and Academician of the RAS **S. B. Seredenin^a**

^a *Federal State Budgetary Institution “Research Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru*

Previously we have shown that the neuropeptide cycloprolylglycine (CPG) is an endogenous positive modulator of AMPA receptors and we have suggested that the pharmacological effects of CPG are associated with brain derived neurotrophic factor. In this paper we have first demonstrated that DNQX, the inhibitor of AMPA-receptors, and K252A, the inhibitor of Trk-receptors, prevented the anxiolytic effect of CPG, which confirms the formulated hypothesis.

Keywords: cyclo-L-prolyl-glycine, anxiolytic activity, brain derived neurotrophic factor (BDNF), TrkB, AMPA